

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-178309

(P2000-178309A)

(43) 公開日 平成12年6月27日 (2000.6.27)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード (参考) |
|---------------------------|------|---------------|-------------|
| C 0 8 F 2/16 | | C 0 8 F 2/16 | 2 G 0 5 4 |
| D 0 6 P 3/00 | | D 0 6 P 3/00 | F 4 H 0 5 7 |
| 5/00 | | 5/00 | D 4 J 0 1 1 |
| 5/20 | | 5/20 | C |
| G 0 1 N 21/76 | | G 0 1 N 21/76 | |

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|--------------------------|----------|-------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平10-357185 | (71) 出願人 | 390024442 株式会社ワイエムシイ |
| (22) 出願日 | 平成10年12月16日 (1998.12.16) | | 京都市下京区五条通烏丸西入龍崎町284番地 |
| | | (72) 発明者 | 民谷 栄一 |
| | | | 石川県能美郡辰口町旭台1-50 A棟15号 |
| | | (72) 発明者 | 村上 裕二 |
| | | | 石川県能美郡辰口町旭台1-50 D棟33号 |
| | | (72) 発明者 | 高橋 洋二 |
| | | | 石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社 |
| | | | ワイエムシイ 技術開発センター内 |
| | | (74) 代理人 | 100079234 |
| | | | 弁理士 神崎 彰夫 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 着色ポリマー粒子およびその製造法

(57) 【要約】

【課題】 水酸基をもった平均粒径5～200 μ mのポリマー粒子の作製方法とこれらの粒子に着色することによって測定物質を定量もしくは定性することができる簡易方法を提供する。

【解決手段】 ポリマー粒子に3原色である赤、青、黄色の色素の混合物で染色し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長の割合から約1万色を識別し、免疫反応の有無を蛍光物質や発光物質の標識物を使用することによって確認できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 疎水性モノマーと架橋剤を溶解した混合溶液を細径ノズルから、反応開始剤を溶解した水溶液中に噴出させて重合させることにより、平均粒径が5～200 μm であるほぼ均一な粒径を有し、色素分子が結合している着色ポリマー粒子。

【請求項2】 疎水性モノマーと架橋剤を溶解した混合溶液を細径ノズルから、反応開始剤を溶解した水溶液中に噴出させて重合させることにより、平均粒径が5～200 μm であるほぼ均一な粒径を有し、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子が個別に結合し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長から個々に識別でき、且つそれぞれに試料中の特定物質を吸着または結合によって固定できる分析試薬。

【請求項3】 疎水性モノマーおよび架橋剤を溶解して混合溶液を調製し、この溶液を細径ノズルからほぼ均一な速度で反応開始剤と界面活性剤を含む水中に噴出させ、さらに攪拌を加えて重合させることで平均粒径5～200 μm ではほぼ均一な粒径を有し、さらに色素分子を結合させる着色ポリマー粒子の製造法。

【請求項4】 疎水性モノマーがスチレン、反応開始剤がラジカル重合開始剤であり、攪拌を加える反応溶液の温度をラジカル生成可能な50～90℃に加温する請求項3記載の製造法。

【請求項5】 疎水性染料で着色するために、水酸基を有するメタクリル酸2-ヒドロキシエチルおよび/またはカルボキシル基を有するメタクリル酸を混合溶液に0.1～10%好ましくは0.5～5%添加する請求項3記載の製造法。

【請求項6】 疎水性染料による着色効率を高めるために、水によるポリマー粒子の洗浄後に、100～200℃で減圧乾燥することによって多孔質ポリマー粒子を得る請求項3記載の製造法。

【請求項7】 平均粒径が5～200 μm であるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子を個別に結合させ、各着色ポリマー粒子に特定成分を固定し、ついで各着色ポリマー粒子の特定成分を試料と選択的に反応させてから、蛍光または発光物質を有する標識溶液を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定する特定成分の分析法。

【請求項8】 平均粒径が5～200 μm であるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子を個別に結合させ、各着色ポリマー粒子に特定の抗体を感作し、ついで各着色ポリマー粒子の抗体を検体の抗原と免疫学的に反応させてから、蛍光または発光物質で標識化した2次抗体を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定する免疫臨床診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ほぼ均一な粒径を有する着色ポリマー粒子およびその製造法に関し、赤、青、黄色の三原色の色素を基本としてすべて異なる色調に着色することにより、同定すべき物質に特異的に反応する抗体などの物質を個別に感作させ、多種類の物質を同時に同定できる着色ビーズ粒子およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】多種類の物質を同時に同定する方法は、臨床診断試薬、環境汚染物質の分析、農薬の分析、遺伝子の分類、医薬品の検査、生化学分野などに利用可能である。既存の同定方法として、公知の診断薬および診断システムにおいて、自動分析機器を使った多検体測定システムはあるが、粒径約200 μm 以下のポリマー粒子1個で対象物質を同定できるような診断薬および診断システムはない。

【0003】例えば、ポリマー粒子の製造法として、ノズルを使ったパーク (T.G.Park) らの報告がある (Journal of Poly. Sci., Poly. Chem. Ed., 505-507, vol. 30(1992))。この製造法では、シリンドーの先から、N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)、N、N-メチレンビスアクリルアミド (MBAAm)、アルギン酸ナトリウム、テトラエチレンジアミン (TEMED) の混合溶液を滴下し、ポリマー粒子を形成している。

【0004】また、着色粒子の製造法として、特開平10-48215号、特開平8-269207号、特開平6-306108号などが存在する。特開平10-48215号では、スチレンと共重合性である不飽和の着色ラテックス粒子の製造について開示している。特開平8-269207号では、溶剤または水に溶解したスチレンアクリル酸樹脂と着色剤を強力な剪断応力で混合し、着色剤を樹脂粒子内に浸透させて着色マイクロカプセルを製造する方法が開示されている。特開平6-306108号では、乳化重合法で製造し、水難溶性着色剤で染色した着色ラテックス粒子について開示している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前記のパークらの報告を参照すると、通常の懸濁重合に比べて、比較的大きい粒径のポリマー粒子を形成できても、ポリマー粒子の粒径が相当に不均一になってしまう。また、前記の諸公報で開示された方法で調製した着色ポリマー粒子は、比較的均一な粒径を有するけれども、一般に粒径が数 μm 以下である非常に細かい粒子であり、粒径を数十 μm の大きさで均一化することは困難である。このため、粒径数十 μm のポリマー粒子を1個ずつ使い、各ポリマー粒子によって対象物質を同定するような測定用途に使用することは実際上不可能である。

【0006】一方、特開平5-273210号では、

粒径が10 μ m以下の着色微粒子を用い、免疫反応が生じて溶液の色が変化することにより、試料中における特定成分の検出を行っている。この測定方法は、目視によって溶液の色の変化を検出するため、特定成分が微量であると検出結果に差異が生じやすく、1回の測定で1種の抗原を検出するだけであるから、多種類の抗原を測定する際には非常に煩雑な作業を要することになる。

【0007】 本発明者らは、着色ポリマー粒子の製造法および免疫測定方法に関する前記の問題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、粒径が10 μ m以上にあることが可能であってしかも粒径がほぼ均一である着色ポリマー粒子を提供することを目的としている。本発明の他の目的は、すべて異なる色調の着色ポリマー粒子に試料中の特定物質を固定して個別に測定できる分析試薬を提供することである。

【0008】 また、本発明の別の目的は、混合溶液をノズルから水溶液中に噴出させて重合し、さらに疎水性染料などを結合させて着色したポリマー粒子の製造法を提供することである。本発明のさらに別の目的は、複数の着色ポリマー粒子を用いて、複数の特定成分を同時に測定できる分析方法ないし免疫臨床診断方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明に係る着色ポリマー粒子は、疎水性モノマーと架橋剤を溶解した混合溶液を細径ノズルから、反応開始剤を溶解した水溶液中に噴出させて重合させることにより、平均粒径が5～200 μ mであるほぼ均一な粒径を有し、さらに色素分子が結合しいる。また、本発明の分析試薬は、平均粒径が5～200 μ mであるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子が個別に結合し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長から個々に識別でき、且つそれぞれに試料中の特定物質を吸着または結合によって固定できる。

【0010】 本発明に係る着色ポリマー粒子の製造法は、疎水性モノマーおよび架橋剤を溶解して混合溶液を調製し、この溶液を細径ノズルからはほぼ均一な速度で反応開始剤と界面活性剤を含む水中に噴出させ、さらに攪拌を加えて重合させることで平均粒径5～200 μ mでほぼ均一な粒径を有し、さらに色素分子が結合させる。本発明方法において、疎水性モノマーがスチレン、反応開始剤がラジカル重合開始剤であり、攪拌を加える反応溶液の温度をラジカル生成可能な50～90℃に加熱すると好ましい。

【0011】 好ましくは、疎水性染料で着色するため、混合溶液に対して、水酸基を有するメタクリル酸2-ヒドロキシエチルおよび/またはカルボキシル基を有するメタクリル酸を0.1～10%添加する。さらに、

疎水性染料による着色効率を高めるために、水によるポリマー粒子の洗浄後に、100～200℃で減圧乾燥することによって多孔質ポリマー粒子を得る。

【0012】 本発明に係る特定成分の検出方法は、平均粒径が5～200 μ mであるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子を個別に結合させ、各着色ポリマー粒子に特定成分を固定し、ついで各着色ポリマー粒子の特定成分を試料と選択的に反応させてから、蛍光物質または発光物質を有する標識溶液を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定する。また、診断方法としては、各着色ポリマー粒子に特定の抗体を感作し、ついで各着色ポリマー粒子の抗体を標識の抗原と免疫学的に反応させてから、蛍光物質または発光物質で標識化した2次抗体を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定すればよい。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明において、所望のポリマー粒子を製造するために、疎水性モノマーと架橋剤を含有する混合溶液を水溶液中に噴出させる細径ノズルおよびその重合反応について、下記のように必要条件を確立している。

- ① ノズルに関して、混合溶液の噴出口を細くするため、噴出口径が約0.1mmであるガラス管も作製した。
- ② ポリマー粒子に関して、その粒径がノズルから噴出させる混合溶液の噴出速度と関係があることを見出した。
- ③ ポリマー粒子に関して、その粒径が反応容器中の溶液の回転速度と関係があることを見出した。

【0014】 疎水性モノマー（単量体）について、着色の容易さを考慮に入れると、水酸基および/またはカルボキシル基を有する不飽和モノマーを混合溶液の0.1～10%好ましくは0.5～5%の範囲で添加すると好適である。疎水性モノマーに関して、これ以外に選択の条件はない。

【0015】 得たポリマー粒子について、化学的結合法で免疫活性物質を固定することを考慮すれば、シード重合時に水酸基および/またはカルボキシル基を有する不飽和モノマーを添加しておく为好ましい。この不飽和モノマーは、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基などの官能基を有すればよく、必要に応じて適宜に選択可能であり、混合溶液の0.5%～20%の範囲で添加すると好ましい。これらの不飽和モノマーの添加には、通常、ポリマー粒子の着色処理を同時に考慮して判断する。

【0016】 前記の混合溶液には、重合を促進する架橋剤を添加することを要する。この架橋剤として、不飽和結合を2個以上有する化合物であるジビニルベンゼン

ン、トリメタクリル酸トリメチロールアロバン、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジメタクリル酸ジエチレングリコール、ジメタクリル酸トリエチレングリコール、ジビニルナフタレン、ジビニルエーテル、フタル酸ジアルリルなどを例示できる。

【0017】 混合溶液を噴出させる水溶液に添加する反応開始剤は、水溶性のラジカル重合開始剤であれば使用可能であり、例えば、過硫酸カリウムまたは過硫酸アンモニウムのような過硫酸塩、4, 4'-アゾビス(2-アミノ吉草酸とその塩または2, 2'-アゾビス(2-アミノジプロパン)塩のようなアゾ系化合物、パーオキサイト化合物などである。この反応開始剤は、反応溶液の水温は反応開始剤の最低ラジカル生成温度以上であればよく、例えば、通常50〜90℃の範囲に加熱する。但し、常温開始の反応開始剤、例えば過酸化水素還元剤(アスコルビン酸など)の組み合わせを用いれば、室温またはそれ以下の温度で重合させることも可能である。

【0018】 疎水性モノマーと架橋剤を含む混合溶液を噴出する水溶液に関して、含有する界面活性剤つまり分散剤として、ドデシルベンゼンスルホン酸塩、ドデシル硫酸塩、セチルトリメチルアンモニウム塩、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩などを例示できる。アルギン酸塩の使用は前記のパークらの報告から既知である。

【0019】 重合実験に際して、混合溶液の噴出口について、その口径がそれぞれ1mm、0.5mm、0.1mmである3種類のノズルを使用した。公知のピストンポンプを用いて、混合溶液を例えば流速0.4ml/分で水中へ噴出実験した結果、細い口径のノズルを使った方がより小さい粒子を調製できることが判明している。

【0020】 ノズルから噴出させる混合溶液の流出速度は、流速0.1〜5.0ml/秒の範囲で調べた結果、平均粒径が5〜200μm好ましくは45〜200μmの範囲において制御可能である。混合溶液の流速が大きくなるに従ってポリマーの粒子径は小さくなり、その粒度分布が不均一になる傾向がある。混合溶液の流出速度を一定にすることにより、得たポリマー粒子の粒度分布は通常の懸濁重合法より均一になる。

【0021】 生成ポリマーの粒子径と反応溶液の攪拌速度との関係は、使用装置によって一概に断定できないが、モータの回転速度を20〜500rpmの範囲で変更すると、回転速度が速い方がより小さいポリマー粒子を作製できる。370rpm以上の回転速度では、それ以上小さい粒子にはならない。この回転速度は、攪拌子の形状や大きさ、回転する反応溶液の量、反応容器的形状や大きさなどによって反応溶液の攪拌効率に影響を与え、この攪拌効率が粒子径を左右していることは確実である。

【0022】 重合反応で得たポリマー粒子は、例え

ば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリメタクリル酸エチル、ポリメタクリル酸n-ブチル、ポリメタクリル酸i-ブチル、ポリメタクリル酸2-エチルヘキシルメタクリル酸ラウリル、ポリメタクリル酸Sラウリル、ポリメタクリル酸ドデシルペンタデシル、ポリメタクリル酸ステアリル、ポリメタクリル酸グリシジル、ポリメタクリル酸2-ヒドロキシエチル、ポリメタクリル酸ヒドロキシプロピル、ポリメタクリル酸ジエチルアミノエチル、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチルメチルクロライド塩、ポリメタクリル酸アリル、ポリメタクリル酸シクロヘキシル、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、ポリカプラミド、ポリエチレンテレフタレートなどである。特に、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸2-ヒドロキシエチルは、0.1〜10%の範囲で含有する水酸基やカルボキシル基がポリマー粒子を着色する際に有効である。

【0023】 ポリマー粒子は、アセトン、メタノール、1N-塩酸、1N-水酸化ナトリウム、ミロQ水の順に数回ずつ遠心洗浄することにより、未反応のモノマー(例えばスチレン)臭が消える。モノマー臭が消えない場合は、さらに同じ洗浄工程を繰り返すことによって解決できる。水によってポリマー粒子を洗浄した後に、疎水性染料による着色効率を高めるために、100〜200℃で減圧乾燥してポリマー粒子を多孔質にすると好ましい。

【0024】 次に、着色用の色素分子として、疎水性染料である反応染料、分散染料、スチレン染料、酸性染料、含金属染料、酸性媒染染料、直接染料、カチオン染料、塩基性染料、硫化染料、油性染料などを挙げることができる。これらの染料のうちで、水酸基やカルボキシル基を含むポリマー粒子には、疎水性染料が結合が容易で反応効率がよい色素分子である。すなわち、反応溶液を水酸化ナトリウムなどでアルカリ性にするにより、疎水性染料はポリマー粒子の水酸基やカルボキシル基と共有結合できる。

【0025】 用いる疎水性染料について、黄色染料には、商品名: Kayaset Yellow 2G, Yellow E-3G, Yellow E-G, Yellow P-RL, Yellow P-3R, Yellow GN, Yellow R liq., Brilliant Yellow 4GE-CF, Yellow P-6GS, Yellow C-5G, Yellow 2G-E, Yellow P-3R, Yellow Light, Yellow K-R, Yellow P-GL, Yellow CN-4G, Yellow A-3R, Yellow P-S8G, Yellow GR, Yellow 3RKなどがある。

【0026】 青色染料には、商品名: Kayaset Blue N, Blue E-R, Blue E-RTN, Blue E-3G, Blue F-R, Brilliant Blue P-BR, Brilliant Blue P-3R, Brilliant Blue RN-S, Brilliant Blue BN, Brilliant Blue RB-CF, Blue P-3R, Blue C-R, Blue 4R, Blue TR-E, Blue H-GN, Blue X-3LR, Brilliant Blue VS-R

W、Brilliant Blue VS-R、Blue CN-R、Blue E-MS、Blue E-NBなどがある。

【0027】 また、赤色染料として、商品名：Kayaset Red B、Red E-B、Red E-RTN、Brilliant Red P-B、Brilliant Red FD P-BN、Brilliant RedG、Brilliant Red RBB、Brilliant Red 5BN、Brilliant Red 2BE-CF、Brilliant Red K-4BL、Brilliant Red K-BGN、Brilliant Red X-2B、Red X-6BN、Brilliant Red 4G-E、Red CN-3B、Red CN-7B、Brilliant Red BB、Red H-3B、Red CX-4B、Red H-EXLなどを挙げることができる。

【0028】 本発明方法によって得た着色ポリマー粒子は、インクや塗料などの着色剤として、そのままの態様で使用するもよく、または各種の添加剤を加え、例えばインクの場合には調節剤および防腐剤などを加えて使用してもよい。また、着色ポリマー粒子を乾燥し、各種の樹脂成形品の着色剤などとして用いることも可能である。

【0029】 着色ポリマー粒子の用途には、その粒度分布や分散安定性などの性能に高精度な制御を必要とするものがあり、例えば、臨床診断試薬、農薬や環境汚染物質などの分析試薬などに応用できる。着色ポリマー粒子を免疫測定法に使用できる診断試薬とするためには、抗体のような免疫活性物質を着色ポリマー粒子に固定化が必要がある。

【0030】 着色ポリマー粒子を免疫学的診断試薬とするために、その粒子表面に免疫活性物質を固定することを要する。免疫活性物質の固定化には、一般に物理的吸着法と化学的結合法が知られている。

【0031】 物理的吸着法は、免疫活性物質を疎水性表面に物理的に吸着して固定する方法である。例えば、スチレンまたはその誘導体、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステルなどによるポリマー粒子では、免疫学的に活性な部位例えば(Fab)'が吸着されない形で容易に固定することができる。当然のことながら、抗体としてIgGを使用する場合には、代わりにFcフラグメントを消化した(Fab')²やFab'を用いてもよい。

【0032】 一方、化学的結合法では、着色ポリマー粒子として、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基などの官能基を有する不飽和モノマーを共重合させたポリマーを用いると好ましい。この着色ポリマー粒子には、公知の二官能性試薬を添加して免疫活性物質を反応させ、共有結合で固定することが可能である。この不飽和モノマーは、シード重合時に添加しておけばよく、例えば、水酸基を持つメタクリル酸2-ヒドロキシエチルやメタクリル酸ヒドロキシプロピル、カルボキシル基を持つメタクリル酸などであり、混合溶液の0.5%~20%の範囲で含有すると好ましい。

【0033】 この明細書において、免疫活性物質は、

抗原、抗体またはレセプターなどであり、例えば、C反応性タンパク質、ヒトIgG、ヒトIgA、ヒトIgM、ヒトIgE、ヒトIgD、癌胎児性抗原(CEA)、 β 2-ミクログロブリン、フェリチン、TPA、IAP(免疫抑制酸性タンパク)、尿中ポリアミン、 α -フエボロチニン、DUPAN-2、CA19-9、CA-50、CA15-3、前立腺特異抗原(PA)、CA-125、CA-130、CA602、CA72-4、神経特異エノラーゼ、APO-AI、APO-AII、APO-B、APO-CII、APO-CIII、APO-Eなどのポリボタンパク、 α 1-ミクログロブリン、 α 2-ミクログロブリン、尿中アルブミン、C3、C4、ハプトグロビン、HBs抗原、HCV抗体、抗ストレプトリジンO(ASO)、カンジダ抗原、アスペルギルス抗原、梅毒(TPHA)、リウマチ因子などの検査項目物質である。同様に、犬、猫、牛、馬、豚のような動物について、その抗原や抗体などを測定することも可能である。

【0034】 この明細書において、抗原とは、人あるいは動物に対して抗体産生を惹起する能力のあるすべての物質のうちで、診断などの特別の目的の下に選択された単一ないし複数の物質またはそれらを含有する混合物を意味している。抗原に対して特異的に結合するのは、通常、その抗体(モノ、またはポリクローナル抗体)である。また、免疫活性物質として、メトレキセート(抗ガン剤)に特異的に結合するDNAオリゴマーを用い、精製したオリゴマーに蛍光物質をラベルして抗原などを測定することも可能である。

【0035】 着色ポリマー粒子は、農薬や環境汚染物質などの分析試薬にも応用できる。この例として、環境汚染物質として指摘されるダイオキシン、田畑やゴルフ場に散布される除草剤、森林に散布される殺虫剤、野菜に付着する各種の農薬の測定に用いることができる。

【0036】 蛍光または発光物質を結合させた着色ポリマー粒子は、色差計を用いて、蛍光度と色調を測定できる。蛍光測定装置として、表面に直径約150 μ mの孔10000個を分散形成したマイクロチェンバープレートを用いると、特定成分を固定してから試料と選択的に反応させた着色ポリマー粒子を前記の孔に1個ずつ入れ、個々に標識溶液を滴下することにより、多数の試験項目を同時に行うことが可能である。

【0037】

【実施例】次に、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0038】実施例

着色ポリマー粒子による臨床診断

【0039】 ポリマー粒子の調製

スチレン90%、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル7%、メタクリル酸1.5%、ジビニルベンゼン1.5%を混ぜて混合溶液を調製する。2リットルの反応容器に

9

は、ミリQ水1リットル、ペルオキソ二硫酸カリウム1 g、アルギン酸ナトリウム10 gを入れ、良く溶解させる。この反応容器は、錠薬の封入下にマントルヒータで85℃に温度を上げた後に、前記のステレン系混合溶液200 mlを口径0.25 mmの自作のガラスノズルから、ペリスタポンプを使って流速0.4 ml/分でゆっくり注入する。この反応時の攪拌モータの回転速度は200 rpmである。混合溶液を約8時間で注入し終えた後に、前記の攪拌回転速度を維持しながら、85℃で2.5時間重合反応を継続する。電子顕微鏡(SEM)写真で計測すると、調製したポリマー粒子の平均粒径は112.4 μmであった。また、このポリマー粒子をミリQ水で10回遠心洗浄した後に、水1リットルに分散させて固形分を測定すると、固形分は8.2%である。

【0040】 ポリマー粒子の着色
前記のポリマー粒子分散液80 mlを反応容器に入れ、攪拌モータによって200 rpmで攪拌しながら、液温を85℃まで上昇させる。疎水性染料(商品名: Kayaset Red B、日本化薬製)2 gを室温でメタノール60 mlに溶解し、伊過した後に、その伊液40 mlを反応容器に加える。また、同じ疎水性染料2 gを室温でトルエン50 mlに溶解し、伊過した後に、その伊液20 mlを反応容器に30分間かけてゆっくりと滴下する。滴下完了後、85℃で8時間攪拌を継続する。この粒子を500 mMのリン酸水素ナトリウムで5回遠心洗浄した後に、ミリQ水で5回洗浄すると、赤色ポリマー粒子を調製できる。着色ポリマー粒子をアルカリ性塩のリン酸水素ナトリウム溶液に浸すことにより、色褪せすることを抑制できる。

【0041】 黄色染料(商品名: Kayaset Yellow 2 G)、青色染料(商品名: Kayaset Blue N)、黒色染料(商品名: Kayaset Black A-N)、橙色染料(商品名: Kayaset Orange A-N)、藍色染料(商品名: Kayaset Blue A-D)を用い、前記と同様の方法によって、6色の着色ポリマー粒子を調製できる。また、赤色染料と黄色染料と黒色染料を5:25:1の比率で用いて茶色ポリマー粒子、赤色染料と青色染料を等量用いて紫色ポリマー粒子、青色染料と黄色染料を10:1の比率で用いて緑色ポリマー粒子を調製する。これらに無着色の白色ポリマー粒子を加えて、全部で10種類の色バリエーションを作製できる。

【0042】 着色ポリマー粒子への抗体の感作
赤色ポリマー粒子について、ミリQ水で遠心洗浄後に上清を取り除く。残った赤色ポリマー粒子100 mgを、20 mMリン酸緩衝液A(pH6.8、0.9% NaCl、0.05% NaN₃)10 mlに分散させる。この溶液にWSC(Water Soluble Carbodiimide、同仁化学研究所製)0.1 gを加え、ボルテックスミキサーで良く攪拌した後に、3時間室温で放置する。このポリマー粒子を前記のリン酸緩衝液10 mlで5回遠心洗浄し、

10

反応しなかったWSCを除去する。このWSC処理により、メタクリル酸由来のカルボキシル基をアミノエステル化した抗体のアミノ基に結合しやすくなる。

【0043】 洗浄した赤色ポリマー粒子(正味100 mg)を20 mMリン酸緩衝液(pH6.8、0.9% NaCl、0.05% NaN₃)10 mlに分散し、この分散溶液に抗インフルエンザA抗体(0.1 mg、マウス由来モノクローナル抗体、アイ・アイ・シージャパンから購入)を加え、室温で30分間、シェーカーで攪拌した後に、3日間冷蔵保存する。この赤色ポリマー粒子を20 mMリン酸緩衝液B(pH6.8、0.9% NaCl、0.05% NaN₃、0.5% 牛血清アルブミン、0.1% カゼイン)10 mlで5回遠心洗浄を行った後に、20 mMリン酸緩衝液A(pH6.8、0.9% NaCl、0.05% NaN₃)10 mlに置換させる。沈殿物が凝集していた場合には、超音波を照射して分散させればよい。

【0044】 他の9種のポリマー粒子には、前記の赤色ポリマー粒子と同様に処理して、それぞれ異なる感染疫に関する抗体を感作する。すなわち、黄色ポリマー粒子には抗クラミジア・トラコマチス抗体(IgG2)(LPS)、青色ポリマー粒子には抗サルモネラ・sp抗体、黒色ポリマー粒子には抗単純ヘルペスウイルスI抗体(IgG2)(gC)、橙色ポリマー粒子には抗トレポネマ・パリーダム(梅毒)抗体、藍色ポリマー粒子には抗ナイセリア・ゴノヘイア抗体(IgG2)(outer mem.)、茶色ポリマー粒子には抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、紫色ポリマー粒子には抗マイコプラズマ・ニューモニア抗体(IgG1)(surface)、緑色ポリマー粒子には抗HBsウイルス抗体(IgG2)(ad&ay)、無着色の白色粒子には抗HCV抗体(capsid)を感作する。

【0045】 蛍光標識した2次抗体の調製
2次抗体として、(1)抗インフルエンザA抗体[US SR型(H1N1)、ヤギ由来IgG分画]、(2)抗クラミジア・トラコマチス抗体[LT2+型、ヤギ由来IgG分画]、(3)抗サルモネラ・sp.抗体[O-抗原&H-抗原、ウサギ由来IgG分画]、(4)抗単純ヘルペスウイルスI抗体[ウサギ由来IgG2分画]、(5)抗トレポネマ・パリーダム(梅毒)抗体[ウサギ由来IgG分画]、(6)抗ナイセリア・ゴノヘイア(淋病)抗体[ATCC31426、ウサギ由来IgG分画]、(7)抗ヘリコバクター・ピロリ抗体[ATCC43504、ウサギ由来IgG分画]、(8)抗マイコプラズマ・ニューモニア抗体[ウサギ由来IgG分画]、(9)抗HBsウイルス抗体[ad&ay、ウサギ由来IgG分画]、(10)抗HCVウイルス抗体[capsid&NS]である10種のポリクローナル抗体を用いる。各抗体3 mgに0.03 mgのFITC(Fluorescein Isotiocyanate Isomer I、同仁化学研究所製)を反応さ

せ、DEAEカラムで分離した結果、波長280nmで吸光度を測定すると42%~58%の回収率を得る。FITC標識したこれらのポリクロール抗体を20mMリン酸緩衝液C(pH6.8、0.9%NaCl、0.05%NaNa₃、0.2%牛血清アルブミン、1%界面活性剤)で希釈し、その濃度を0.01mg/mlに調整する。これらの抗体溶液を100μlずつ試験管に入れ、ボルテックスミキサーで良く攪拌し、約1mlの標識抗体(2次抗体)溶液とする。

【0046】 免疫学的反応とその測定

各抗体を感作した10種の着色ポリマー粒子を2個ずつ取り出して試験管に入れ、さらに100μlの20mMリン酸緩衝液Cを加える。この溶液に、健康者の血清で100倍希釈したクラミジア抗原(アイ・アイ・シージャパンから購入)を10μl添加し、室温で1時間反応させた後に、20mMリン酸緩衝液Cで5回速心洗浄する。四角錐の孔を10000個設けたマイクロチェンバプレートを用い、該プレートの個々の孔に反応済みの着色ポリマー粒子を1個ずつ挿入する。

【0047】 前記で調製済みの標識抗体(2次抗体)溶液を、着色ポリマー粒子を1個ずつ入れたプレート孔に1滴ずつ滴下し、室温で1時間反応させる。プレート孔内の着色ポリマー粒子をそれぞれ20mMリン酸緩衝液Cで洗浄した後に、蛍光測定装置によって粒子表面の蛍光を観察する。この結果、2個の黄色ポリマー粒子だけにFITCの蛍光度(波長500nm)が認められた。

【0048】 同様に、各抗原を含有する血清または血漿を反応させることにより、多数の感染症の測定を定性

的に観察できることが明白である。ポリマー粒子1個毎の色を観察するには反射型顕微鏡(倍率500倍)を用いる。この実施例では感染症関連の項目を対象に実施したが、例えば癌マーカーの測定などに用いると、1回の蛍光測定で約1万項目まで同時に測定可能である。

【0049】

【発明の効果】本発明に係る着色ポリマー粒子は、粒径がほぼ均一であるので粒子1個ずつで対象物質を同定するような用途に使用可能である。このポリマー粒子には、赤、青、黄色の三原色を含む各色の色素分子が個別に結合し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長から非常に多数に識別できることにより、試料中の特定物質を固定して個別に測定する分析試薬などとして適用できる。本発明の着色ポリマー粒子は、多種類の物質を一時に同定することにより、臨床診断試薬、ダイオキシンのような環境汚染物質や農薬などの分析試薬、遺伝子の分類または遺伝子の診断試薬、医薬品の検査、生化学分野などに適用可能である。

【0050】 本発明に係る製造法は、粒径がほぼ均一のポリマー粒子を得るために、疎水モノマーを主成分とする混合溶液を水中に噴出させるだけの容易な方法である。本発明の分析方法は、1試験項目に対して1個のポリマー粒子で定性できるので製造原価が安く、試薬量を少量化でき、さらに検査項目の選択が自由であるうえに、色差計を用いて多種類の着色ポリマー粒子を同時に識別でき、多項目の同時測定が可能である。本発明の臨床診断方法は、免疫反応について非常に多くの項目を一回の測定で短時間に同時測定が可能となり、DNA診断へも応用可能である。

フロントページの続き

| (51)Int. Cl. ⁷) | 識別記号 | F I | テマコード(参考) |
|--|-------|---|---|
| G 0 1 N 21/78 33/543 | 5 2 5 | G 0 1 N 21/78 33/543 | C 5 2 5 G 5 2 5 W 5 2 5 U 5 4 1 Z |
| 33/545 | 5 4 1 | 33/545 | A |
| (72)発明者 下村 泰志 石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社 ワイエムシイ技術開発センター内 | | Fターム(参考) 2G054 A002 A006 A010 A040 B005 CE01 CE10 EA01 EA03 4H057 A002 BA01 BA10 CA03 CA38 CB16 CC02 DA02 DA29 DA32 GA07 HA01 JA10 JA14 JB03 4J011 AA05 AA08 AB09 BA08 BB01 BB11 BB13 | |
| (72)発明者 清水 範英 石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社 ワイエムシイ技術開発センター内 | | | |